

# Agilent Fragment Analyzer System 簡易マニュアル

## HS RNA Kit (15 NT)

DNF-472-0500 (500 Samples) / DNF-472-1000 (1000 Samples)

各キットを初めてご使用の際には必ず英語版の Kit Guide をご一読ください。

本マニュアルはソフトウェア 1.1.0.11 以上に対応しています。

本マニュアルに記載した内容は予告なしに変更することがあります。

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures

Version 2024\_09

### キットの構成

#### DNF-472-0500 (500 Samples)

型番	名称	個数
室温保管		
DNF-475-0050	5x Capillary Conditioning Solution, 50 mL	1
	Eppendorf LoBind 0.5 mL tubes (bag of 50)	1
冷蔵保管 (4°C)		
DNF-265-0240	RNA Separation Gel, 240 mL	1
DNF-355-0125	5x 930 dsDNA Inlet Buffer, 125 mL	1
DNF-497-0125	0.25x TE Rinse Buffer, 125 mL	1
DNF-301-0008	BF-1 Blank Solution, 8 mL	1
冷凍保管 (-20°C)		
DNF-600-U030	Intercalating Dye, 30 µL	1
DNF-370-0004	HS RNA Diluent Marker (15 nt), 4 mL	3
冷凍保管 (-80°C)		
DNF-386-U015	HS RNA Ladder, 15 µL	1

#### DNF-472-1000 (1000 Samples)

型番	名称	個数
室温保管		
DNF-475-0100	5x Capillary Conditioning Solution, 100 mL	1
	Eppendorf LoBind 0.5 mL tubes (bag of 50)	1
冷蔵保管 (4°C)		
DNF-265-0500	RNA Separation Gel, 240 mL	1
DNF-355-0300	5x 930 dsDNA Inlet Buffer, 300 mL	1
DNF-497-0250	0.25x TE Rinse Buffer, 250 mL	1
DNF-301-0008	BF-1 Blank Solution, 8 mL	1
冷凍保管 (-20°C)		
DNF-600-U030	Intercalating Dye, 30 µL	2
DNF-370-0004	HS RNA Diluent Marker (15 nt), 4 mL	6
冷凍保管 (-80°C)		
DNF-386-U015	HS RNA Ladder, 15 µL	2

## 必要な試薬・器具・消耗品

### 試薬

- ・ **Capillary Storage Solution (GP-440-0100)** キットに付属していません。
- ・ **脱イオン水 (sub-micron filtered)** 試薬希釈用
- ・ **ミネラルオイル** 必要に応じてご用意ください。

### 消耗品

- ・ **96-well PCR sample plate** サンプル/Rinse プレート用 下表のいずれかをご用意ください

メーカー	型番	名称
Eppendorf	951020303 (Various colors)	Eppendorf 96-Well twin.tec PCR Plates, Semi skirted
MidSci	AVRT1	Pryme PCR Ergonomic Plates, 96x0.2ml, Semi Skirted, Natural
BioRad	HSS-9601	Hard-Shell Full-Height 96-Well Semi-Skirted PCR Plates
Azenta (4titude)	4ti-0900, -0770/C	FrameStar 96 semi-skirt
Scientific Specialty	3450-00	96-Well Semi Skirt UltraFlux PCR Plate
Neptune	3742.X	Semi-Skirted 96-Well PCR Plates

- ・ **96-deepwell 1 mL plates** Buffer/廃液プレート用 下表のいずれかをご用意ください

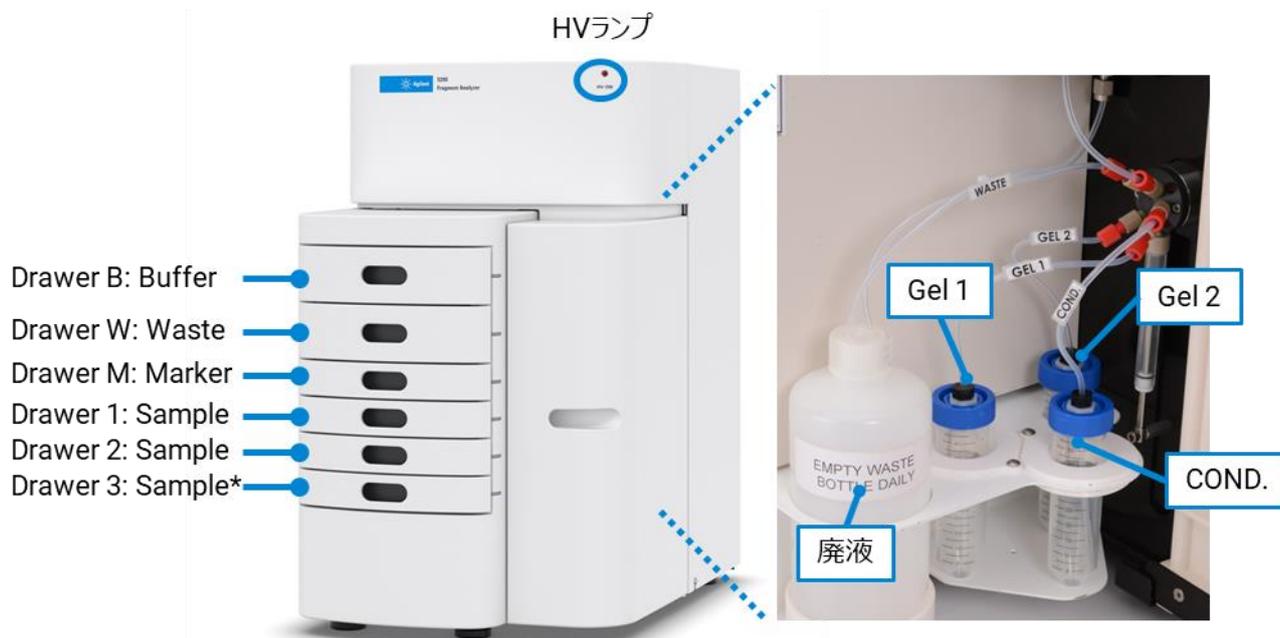
メーカー	型番	名称
Fisher Scientific	12-566-120	Fisherbrand 96-Well DeepWell Polypropylene Microplates; Well Capacity: 1 mL
Thermo Fisher Scientific	260251 / 260252	Nunc 96-Well Polypropylene DeepWell Storage plates
Agilent	P60-20	96 Well Buffer/Waste Tray, case of 50

- ・ **遠沈管** Corning #352070 (50 mL) / Corning #430776 (250 mL) (相当品)
- ・ **プレートシール** プレート遠心時に使用
- ・ **Eppendorf 0.5 mL LoBind tubes** (推奨) Ladder の分注に使用

### 器具

- ・ シリンダーまたはピペッター・ディスポピペット
- ・ マイクロピペッター・ピペットチップ
- ・ ボルテックスミキサー
- ・ プレート遠心機
- ・ サーマルサイクラまたはヒートブロック (熱変性に使用)

## 各部の名称



名称	機能
Drawer B	Buffer プレートを設定します。
Drawer W	廃液プレート (96-deepwell plate) または Open Waste Tray (P60-22) を設定します。
Drawer M	Marker または Rinse プレートを設定します。
Drawer 1-3	サンプルプレートを設定します。 *5300 Fragment Analyzer の場合、Drawer 3 に Storage プレートを設定します。
Gel 1 and 2	調製した Gel-Dye Mix を設定します。
COND.	1x Conditioning Solution を設定します。
廃液	分析ごとに廃液がたまります。
HV ランプ	電圧が印加されている際に点灯します。

## はじめに

### 試薬の準備

- Ladder、Diluent Marker は氷上で溶かしてから使用します。
- それ以外の試薬は 30 分以上室温に置いてから使用します。
- 動作環境温度は 19～25℃です

### システムの起動

PC → 装置 → Fragment Analyzer Controller Software の順にシステムを起動します。



ソフトウェア  
アイコン



ログイン画面

- サンプル・試薬調製前にシステムを立ち上げます。
- 初期アカウント設定は以下の通りです。  
User ID: administrator  
Password: 空欄

### 廃液

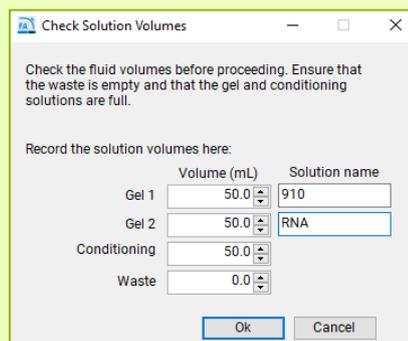
#### 1. Drawer W 内の廃液プレートの廃液を空にします。

- 分析日のはじめまたは 8 分析ごとに行います。
- 96-deepwell 1 mL plate の代わりに Open Waste Tray (P60-22) を使用できます。

#### 2. 廃液ボトルを空にします。

- 必要に応じて行います。
- ソフトウェア上で 450 mL 以上の液量が入っている場合、分析を追加することができません。

ボトルの液量を変更した際にはソフトウェアの  
**Utilities → Solution Levels**  
から変更後の液量を入力します。



Check Solution Volumes

Check the fluid volumes before proceeding. Ensure that the waste is empty and that the gel and conditioning solutions are full.

Record the solution volumes here:

	Volume (mL)	Solution name
Gel 1	50.0	910
Gel 2	50.0	RNA
Conditioning	50.0	
Waste	0.0	

Ok Cancel

## 試薬の調製・セット

### Gel-Dye Mix

#### 1. Separation Gel と Intercalating Dye を混合します。

- 液量は次ページを参照ください。
- Prime を行う場合には 表の液量 + 2.5 mL 分を使用します。
- 泡立てないように転倒混和でゆっくり、しっかりと攪拌します。

#### 2. 装置にセットします。

- Gel 1 または Gel 2 にセットし、ソフトウェアから液量を変更します。
- 液量が不足している場合は分析を入力することができません。

- Intercalating Dye は遮光状態で 30 分以上室温に戻し、よく攪拌してから使用してください。
- Gel-Dye Mix は分析日ごとに調製してください。

### 1x Conditioning Solution

#### 1. 5x Conditioning Solution を希釈します。

- 液量は次ページを参照ください。
- 脱イオン水で 5 倍に希釈し、泡立てないように混合します。

#### 2. 装置にセットします。

- COND.のラインにセットし、ソフトウェアから液量を変更します。
- 液量が不足している場合は分析を入力することができません。

希釈した 1x Conditioning Solution は室温で保管できます。  
希釈後もボトル記載の期限内にご使用ください。

### Prime

Prime は流路の溶液を置換する際に行います。2.5 mL の溶液を使用します。

使用する Gel-Dye Mix の種類を切り替える、ライン中の古い溶液を交換する、流路中の気泡を取り除く際に行います。

#### 分析開始前に行う場合：

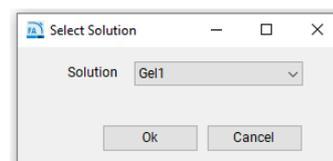
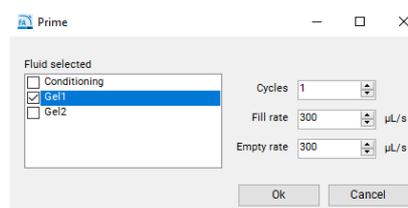
メニューバーより Utilities > Prime を選択します。

Prime を行う溶液にチェックを入れ、OK をクリックすると Prime が始まります。

#### 自動分析中に行う場合：

Method Queue 上で右クリックし、Insert Prime を選択します。

Prime を行う溶液を選択し OK をクリックすると Method Queue (12 ページ) に追加されます。



## 必要な試薬液量

---

### 5200 Fragment Analyzer (12 本キャピラリー)

分析サンプル数 (分析回数)	Intercalating Dye	Separation Gel	1x Conditioning Solution
12 (1)	1.0 $\mu$ L	10 mL	10 mL
24 (2)	1.5 $\mu$ L	15 mL	15 mL
36 (3)	2.0 $\mu$ L	20 mL	20 mL
48 (4)	2.5 $\mu$ L	25 mL	25 mL
96 (8)	4.5 $\mu$ L	45 mL	45 mL

### 5300 Fragment Analyzer (48 本キャピラリー)

分析サンプル数 (分析回数)	Intercalating Dye	Separation Gel	1x Conditioning Solution
48 (1)	2.5 $\mu$ L	25 mL	25 mL
96 (2)	4.0 $\mu$ L	40 mL	40 mL
144 (3)	5.5 $\mu$ L	55 mL	55 mL
192 (4)	7.0 $\mu$ L	70 mL	70 mL
288 (8)	10.0 $\mu$ L	100 mL	100 mL

### 5300 Fragment Analyzer (96 本キャピラリー)

分析サンプル数 (分析回数)	Intercalating Dye	Separation Gel	1x Conditioning Solution
96 (1)	4.0 $\mu$ L	40 mL	40 mL
192 (2)	8.0 $\mu$ L	80 mL	80 mL
288 (3)	12.0 $\mu$ L	120 mL	120 mL
384 (4)	16.0 $\mu$ L	160 mL	160 mL
480 (5)	20.0 $\mu$ L	200 mL	200 mL

## 1x Inlet Buffer

### 1. 5x dsDNA 930 Inlet Buffer を希釈します。

- 脱イオン水で 5 倍に希釈し、泡立えないように混合します。

希釈した 1x Inlet Buffer は 4℃ で保管できます。  
希釈後もボトル記載の期限内に使用ください。

### 2. Buffer Plate に分注します。

- 96-deepwell 1 mL plate 指定の Well に 1 x Inlet Buffer を 1 mL ずつ加えます。

12 本キャピラリー : A 行のすべての Well  
48 本キャピラリー : A-D 行すべての Well  
96 本キャピラリー : すべての Well

1x Inlet Buffer は分析日の始めと 8 分析ごとに交換します。継ぎ足さずに新しい溶液に交換します。  
12 本キャピラリーの場合はステージを Park にして Plate を取り出してください。操作方法はステージの操作を参照してください。

Buffer プレートは定期的に新品に交換してください。

### 3. Drawer B にセットします。

- 分注した Buffer プレートの A 行が奥側となるようにセットします。

## Storage Solution の交換

### 1. Storage プレートを取り出します。

- ステージ操作アイコンの Park をクリックし、Storage Buffer が分注されたプレートを取り出します。

**5200 Fragment Analyzer :**  
Drawer B の Buffer プレート (96-deepwell 1 mL plate)  
**5300 Fragment Analyzer :**  
Drawer 3 の 96-well sample plate

Storage Solution の交換は 2~4 週間に 1 度行ってください。  
設置環境によって頻度は変わります。

Storage プレートは定期的に新品に交換してください。

### 2. Storage Solution を交換します。

- プレートに残っている Storage Solution を廃棄し、新しい Storage Solution を加えます。

12 本キャピラリー : H 行のすべての Well に 1 mL  
48 本キャピラリー : A-D 行すべての Well に 100  $\mu$ L  
96 本キャピラリー : すべての Well に 100  $\mu$ L

### 3. プレートをセットします。

- もとの Drawer に戻し、ステージ操作アイコンの Store をクリックします。

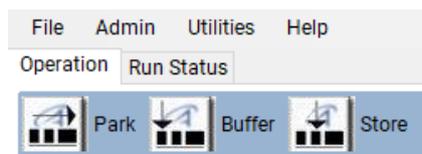
## ステージの操作

ソフトウェア左上のステージ操作アイコンより、ステージを操作できます。

Park : ステージが保持しているプレートを Drawer に戻します。

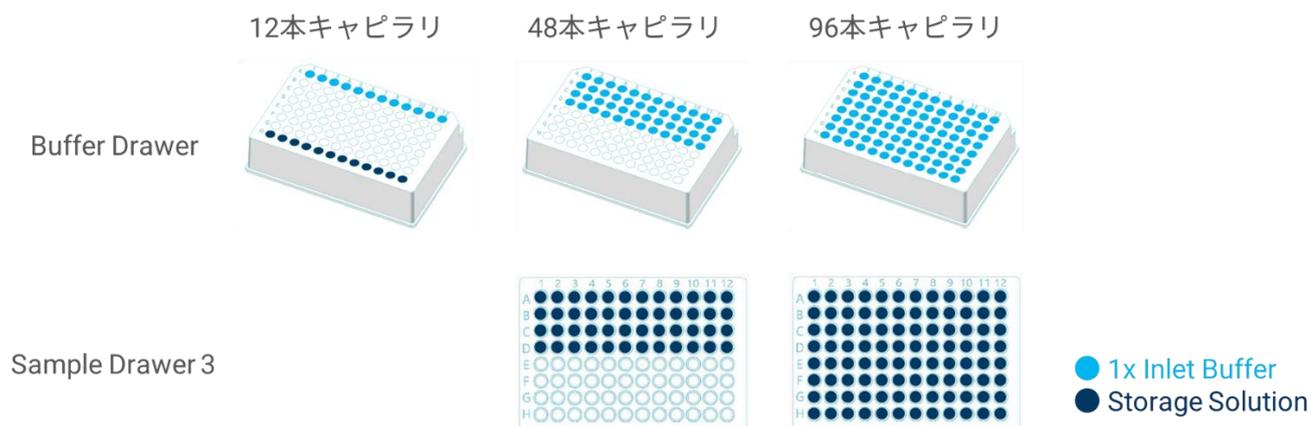
Buffer : 1x Inlet Buffer がキャピラリーに浸る位置にプレートを移動します。

Store : Storage Solution がキャピラリーに浸る位置にプレートを移動します。



ステージ移動画面が表示されている、およびステージの動作音がしている間は Drawer を開けないでください。

## HS RNA Kit (15 NT)



## Rinse Buffer

### 1. 0.25x TE Rinse Buffer を分注します。

- 96-well sample plate の指定の Well に 200  $\mu\text{L}$  分注します。

12 本キャピラリー : A 行のすべて

48 本キャピラリー : A-D 行

96 本キャピラリー : すべての Well

Rinse Buffer は**分析日の始め**に新しく分注します。

分注位置を変更する場合は分析 Method の入力時に Edit より指定を変更する必要があります。

### 2. Rinse プレートを Drawer M にセットします

- プレートの A 行が奥側になるようにセットします。



## サンプル・Ladder の調製

### サンプル推奨濃度

#### IVT mRNA の場合\*

(Low) 500~2,500 pg/ $\mu\text{L}$  (Mid) 2,500~10,000 pg/ $\mu\text{L}$

**Total RNA** : 50~5,000 pg/ $\mu\text{L}$

**mRNA** : 500~5,000 pg/ $\mu\text{L}$

濃度が高い場合には RNase free Water で希釈してください。

Marker/Ladder は室温に戻した後、よく攪拌して使用してください。

サンプル・Ladder の調製には指定の 96-well PCR sample plate を使用してください。

\* IVT mRNA の場合、サンプルの濃度・サイズによって選択する分析メソッドが異なります。

詳細は p14 をご参照ください。

## Ladder の調製

1. (初回使用時に) Ladder を 3 $\mu$ L ずつ分注します。
2. 2  $\mu$ L を新しいチューブに取り分け、70 $^{\circ}$ C で 2 分間熱変性を行い、氷上で急冷します。
3. RNase free Water を 23  $\mu$ L 加え希釈します。
4. Diluent Marker 18  $\mu$ L と Ladder 2  $\mu$ L を指定の Well に加えます。

12 本キャピラリー：分析行 12 列目

48 本キャピラリー：D12 または H12

96 本キャピラリー：H12

推奨のチューブ (Eppendorf 0.5 mL LoBind tube) に分注します。

分注した Ladder は-70 $^{\circ}$ C で保存します。

熱変性・希釈後の Ladder は 1 日の使用量ごとに分注し、-80 $^{\circ}$ C に保存します。再融解後の Ladder はその日のうちに使用します。

6000 nt を超える IVT mRNA で Extended method を使用する場合、キット付属の Ladder の代わりに Ronza 社の RNA Marker を使用してください。詳細は p14 をご参照ください。

## サンプルの調製

1. サンプルを 70 $^{\circ}$ C で 2 分間加熱し、4 $^{\circ}$ C で急冷します。
2. サンプルを分析する Well に Diluent Marker を 18  $\mu$ L ずつ分注します。

3. サンプルを 2  $\mu$ L ずつ加えます。

空の Well には Blank Solution 等のバッファーを 20  $\mu$ L 加えます。

4. Ladder/サンプルと Marker を混合します

推奨の方法は以下の通りです。

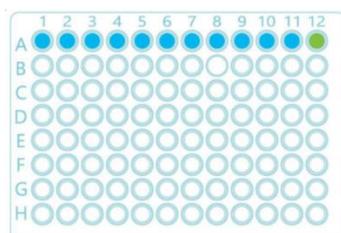
プレートにシールし、3,000 rpm で 2 分間ボルテックス またはピペッターを 20  $\mu$ L にセットし、5~10 回ピペッティング

5. サンプルプレートをセットします。

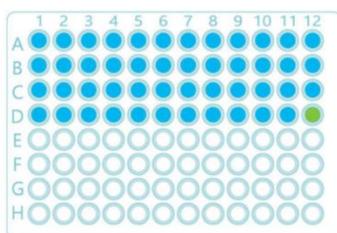
プレートにシールしスピンドウンス溶液中の気泡を取り除いた後、プレートシールをはがし Drawer 1~3 のいずれかにセットします。

プレートは A 行が奥側となるようにセットします。

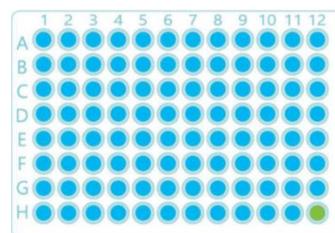
12本キャピラリー



48本キャピラリー



96本キャピラリー



● サンプル  
● Ladder

## 分析

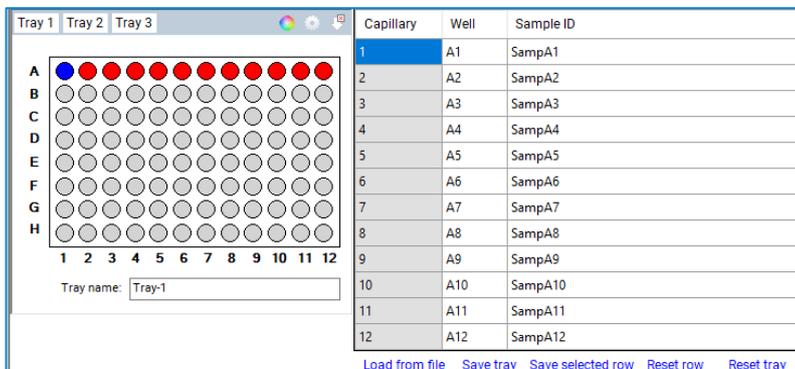
### サンプルの選択・入力

#### 1. 分析するトレイ・サンプルを選択します。

- 画面左上のプレートマップから選択します。

#### 2. サンプル名を入力します。

- 直接入力、あるいは csv, txt ファイルのインポートができます。
- その他以下の操作を行えます。



**Load From File**

**Save Tray**

**Save Selected Row**

**Reset Row**

**Reset Tray**

.txt、.csv 形式のファイルをインポートします。

選択トレイのサンプル名を出力します。

選択行のサンプル名を出力します。

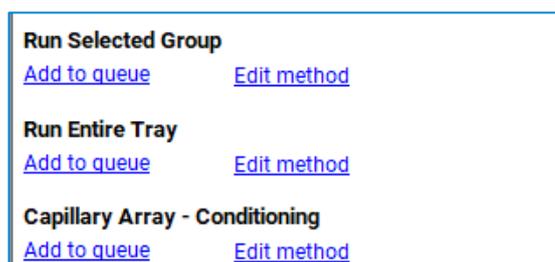
選択行のサンプル名をデフォルトに戻します。

選択トレイのサンプル名をデフォルトに戻します。

## 分析 Method の入力

### 1. Add to queue をクリックします。

- 選択したサンプル位置の分析を行う場合は“Run Selected Group”の“Add to queue”をクリックします。
- 1トレイ全体の分析を行う場合、“Run entire Tray”の“Add to queue”をクリックします。



### 2. Method を入力します。

- “Method” プルダウンメニューから適切なメソッドファイルを選択します。

① Total RNA 分析の場合

DNF-472T(22/33/55)\* - HS Total RNA 15nt.mthds

② mRNA 分析の場合

DNF-472M(22/33/55)\* - HS mRNA 15nt.mthds

(Ultra-Short : 22、Short : 33、Long : 55)

③ IVT mRNA 分析の場合

p14 をご参照ください。

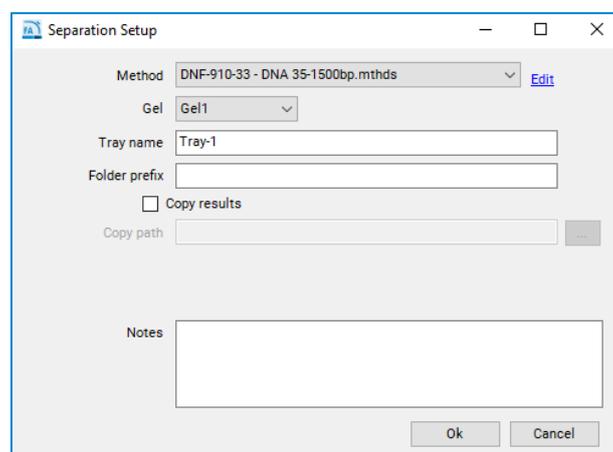
- “Edit” から Rinse Buffer を分注した Well の位置を変更できます。
- “Gel” プルダウンメニューから使用する Gel を選択します。
- その他の項目は必要に応じて入力します。

Tray name : トレイ名

Folder Prefix : フォルダ名の接頭

Copy results : 分析結果のコピーを別のフォルダに保存できます。  
チェックを入れた場合、Copy Path より保存先を指定してください。

Notes : 自由記入欄

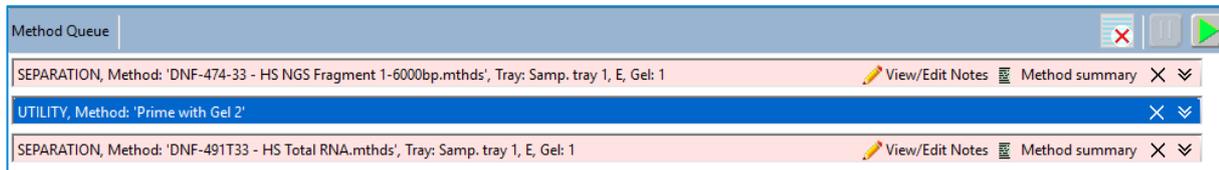


### 3. OK をクリックします。

- Method Queue に分析が追加されます。

## Method Queue

- Method Queue には入力した分析・コンディショニングメソッドが表示されます。
- 分析を開始するとリストの上のアイテムから連続分析を行います。
- メソッドの順序はアイテムをドラッグすることで変更できます。



**Clear**

Method Queue 内のメソッドをすべて削除します。



**Pause**

現在行っているメソッドが完了した後、連続分析を中断します。



**Start**

メソッドを開始します。

**View/Edit Notes**

分析メモの確認・入力ができます

**Method Summary**

Method の詳細を表示・編集が行えます



入力した Method を削除します

以下は Method Queue 上で右クリックすることで表示することができます。

**Insert Pause**

連続分析の一時停止を Queue に追加します。

**Insert Prime**

Prime のメソッドを Queue に追加します。  
連続分析中に使用するゲルを切り替える際に使用します。

## 分析の開始

### 1. 分析開始前に、下記について再度確認します。

- Drawer が完全に閉じていますか？
- プレートは A 行が奥向きになるようセットされていますか？
- プレートシールははがされていますか？

### 2. Method Queue の をクリックします。

Full Conditioning を行い、ゲル充填後にサンプルのインジェクション、電気泳動を行います。

Method Queue に入力された分析をリストの上から順に連続で行います。

## 分析中の注意点

### 分析中は以下の点にご注意ください。

- ステージ稼働中に Drawer を開けないでください。
- 泳動中（HV ランプ点灯中）に Drawer B、Drawer W、装置上部のフードを開けないでください。
- 分析中に装置以外の機器との USB 通信を行わないでください。

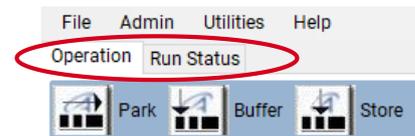


## 分析中の操作

- 分析を開始すると“Run Status”タブに自動で切り替わります。“Run Status”タブは装置で行っている動作を確認することができます。
- “Operation”タブから追加の分析を入力できます。
- 分析を中断する場合には、“Run Status”画面右上の  を選択します。

次の分析が自動で始まります。

連続分析を中断する場合には“Method Queue”の Pause をクリックしてから“Abort all”を選択して下さい。



## 分析の終了

- Method Queue に入力したすべての分析が完了すると、“Operation”タブに自動で戻ります。ProSize Data Analysis Software よりデータの確認・解析を行ってください。
- データはデフォルトで以下に保存されています。  
C:\¥Agilent Technologies¥Data¥(日付ごとのフォルダ)¥
- 廃液を捨て、ソフトウェア ➡ 装置 ➡ PC の順にシステムをシャットダウンします。

## In vitro Transcribed (IVT) mRNA 分析

このセクションでは IVT mRNA を分析する際の推奨条件について説明しています。詳細は以下のアプリケーションノートを参照ください。IVT mRNA 解析は Short キャピラリーのみで検証されています。

- High-Sensitivity IVT mRNA Analysis Using the Agilent Fragment Analyzer Systems (5994-7644EN)

### Ladder

---

6000 nt を超える IVT mRNA の解析には Ronza 社の RNA Marker (#50705) を 25 ng/μL に希釈して、キット付属の Ladder の代わりに使用します。希釈後の分注・調製方法はキット付属の Ladder と同様です。p9 をご参照ください。

### メソッドの選択

---

サンプルの濃度、サイズによって 4 種類のメソッドから適切なものを選択してください。

- ① **DNF-472A33 – HS IVT mRNA Low Concentration**  
サイズ：200～6,000 nt  
濃度：500～2,500 pg/μL
- ② **DNF-472AE33 – HS IVT mRNA Extended Low Concentration**  
サイズ：500～9,000 nt  
濃度：500～2,500 pg/μL
- ③ **DNF-472B33 – HS IVT mRNA Mid Concentration**  
サイズ：200～6,000 nt  
濃度：2,500～10,000 pg/μL
- ④ **DNF-472BE33 – HS IVT mRNA Extended Mid Concentration**  
サイズ：500～9,000 nt  
濃度：2,500～10,000 pg/μL

## Kit スペック

		HS RNA Kit (15NT)	
		Total RNA	mRNA
サイズ範囲		200 - 6,000 nt	
サイズ真度 <sup>1</sup>		± 20%	
サイズ再現性 <sup>1</sup>		20% CV	
検出限界 (S/N > 3) <sup>2</sup>		50 pg/μL	250 pg/μL
定量範囲 (スメア) <sup>2</sup>		50 – 5,000 pg/μL	500 – 5,000 pg/μL
定量真度 <sup>1</sup>		± 30%	
定量再現性 <sup>1</sup>		20 % CV	
泳動時間	US	31 min	
	S	40 min.	
	L	70 min.	

<sup>1</sup> Results using RNA Ladder as sample and 33-55 capillary array

<sup>2</sup> Results using Total RNA and ribo-depleted mRNA samples diluted in nuclease-free water

US = Ultra Short, S = Short, L = Long (Ultra Short は 5200 Fragment Analyzer のみ)

## Kit スペック

		HS RNA Kit (15NT) _ IVT mRNA			
メソッド		method A	method AE	method B	method BE
	濃度	Low		Mid	
	インジェクション時間	150 s		50 s	
	泳動時間	Standard	Extended	Standard	Extended
サイズ範囲	200 - 6,000 nt	500 - 9,000 nt	200 - 6,000 nt	500 - 9,000 nt	
濃度範囲 <sup>1</sup>	500 - 2,500 pg / $\mu$ L		2,500 - 10,000 pg / $\mu$ L		
感度 <sup>1</sup>	15 pg/ $\mu$ L		NA		
サイズ真度 <sup>1</sup>	$\pm$ 15%				
サイズ再現性 <sup>1</sup>	<10%		<5%		
定量真度	NA				
定量再現性	NA				
泳動時間	S	45 min	90 min	45 min	90 min

<sup>1</sup> Results using 1,800 nt, 4,300 nt, and 9,000 nt IVT mRNA with no modifications on the 5200 and 5300 Fragment Analyzer instruments with the FA Capillary Array Short, 33 cm.

### プロトコルなどのダウンロードサイト

[https://www.chem-agilent.com/lscabooth/DNAMicroArray/yan\\_MicroArray.htm](https://www.chem-agilent.com/lscabooth/DNAMicroArray/yan_MicroArray.htm)

(ログイン ID、パスワードはお問い合わせください。)

### 製品に関するお問い合わせ

Tel: 0120-477-111

Mail: [email\\_japan@agilent.com](mailto:email_japan@agilent.com)

電話・メール受付時間 土、日、祝祭日、5/1 を除く

9 : 00~12 : 00、13 : 00~17 : 00